

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

Код за НК 024:2023 – **59085**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

ТУ У 24.4-24607793-018-2003

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКУ У СЕЧІ ТА ЛІКВОРИ ПРИЗНАЧЕННЯ

IVD

Набір призначений для визначення концентрації загального білку у сечі та спинномозковій рідині (СМР) людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях і науково-дослідній практиці.

Набір розрахований (з **урахуванням холостих та калібрувальних проб**) на відповідну кількість визначень загального білку (Див. **Примітку 6**).

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP010.02</u>	200	100	50	<u>HP010.06</u>	100	50	25
<u>HP010.05</u>	50	25	12				

Діапазон визначаємих концентрацій — від 50 мг/л до 2000 мг/л.

Коефіцієнт варіації визначення – не більше 5 %.

Чутливість ¹² на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,003 г/л (600 нм).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Уникати влучення прямих сонячних променів!

Гарантійний строк придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Білки утворюють з пірогалоловим червоним/молібдатом забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину прямо пропорційна концентрації білків в аналізованому розчині.

СКЛАД НАБОРУ

- Монореагент
 - пірогалоловий червоний - (50,0 ± 2,5) ммоль/л;
 - молібдат натрію - (0,040 ± 0,002) ммоль/л;
- Калібрувальний розчин альбуміну (1000 ± 40) мг/л
 - альбумін - (1000 ± 40) мг/л
 - хлорид натрію - (9,00 ± 0,18) г/л

HP010.02 - 2 флакони по (100 ± 2) мл або
4 флакони по (50 ± 2) мл;
HP010.05 - 1 флакон з (50 ± 2) мл;
HP010.06 - 1 флакон з (100 ± 2) мл або
2 флакони по (50 ± 2) мл;

HP010.02, HP010.05, HP010.06
- 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл.

ОБЛАДНАННЯ

- Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **600 (590-620) нм** у діапазоні (0-1,0) од. оптичної щільності та довжині оптичного шляху 10 мм (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача**).
- Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
- Піпетки місткістю 1; 2; 5 та 0,1 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ**Сеча, СМР.**

- Сеча добова або зібрана випадково.** Не застосовувати консервантів. Під час збору зразки тримати на льоду. Центрифугувати при 900 g. Ніяких спеціальних добавок або консервантів не потрібно.

Аналізувати відразу по закінченні збору зразків. Зразок стабільний протягом року при температурі мінус 20 °С.

- СМР.** Центрифугувати при 900 g і довести рН до 7,0. Аналізувати негайно. Зразок стабільний протягом 3-х діб при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С або 6 місяців при температурі мінус 20 °С. Досліджувані зразки не повинні містити крові.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Монореагент** - готовий до роботи. Після використання реактиву для аналізу НЕГАЙНО закрийте флакон, щоб уникнути випаровування або контамінації реактиву. Реагент стабільний протягом 30 діб при температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С у темряві. **(НЕ ЗАМОРОЖУЙТЕ РЕАГЕНТ!)**
2. **Калібрувальний розчин альбуміну (1000 ± 40) мг/л** - готовий до застосування. Розчин стабільний при зберіганні в темному місці. Після розкриття розчин стійкий близько 7 діб при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять у відповідності зі схемою представленою в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба			Калібрувальна проба			Холоста проба		
	Макро	Напівмікро	Мікро	Макро	Напівмікро	Мікро	Макро	Напівмікро	Мікро
Монореагент	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00
Аналізуємий розчин	0,08	0,04	0,02	-	-	-	-	-	-
Калібрувальний розчин	-	-	-	0,08	0,04	0,02	-	-	-
Дистильована вода	-	-	-	-	-	-	0,08	0,04	0,02

Розчин у пробірці ретельно перемішують і витримують **10 хв** при температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби $E_{\text{досл}}$ і калібрувальної проби $E_{\text{кал}}$ **проти холостої проби**. Остаточне забарвлення стабільне протягом **10 хв** після закінчення інкубації за умови запобігання від дії прямого сонячного світла.

Фотометрування - див. розділ «Обладнання»

РОЗРАХУНОК ведуть за формулами (1,2):

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 1000 \text{ мг/л, де} \quad (1)$$

- C – концентрація білку у дослідній пробі, мг/л;
- $E_{\text{досл}}$ – опт. щільність дослідної проби, од. опт. щільності;
- $E_{\text{кал}}$ – опт. щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;
- 1000 – концентрація білку в калібрувальному розчині, мг/л.

У добовій сечі:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times V \text{ (г/доба)}, \quad (2)$$

де V – об'єм добової сечі, л.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні розчини білків зі значеннями концентрації, визначеними даним методом. Наприклад: „Філісіт – КГБС” (Україна).

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

- сеча в спокої - до 0,08 г/добу ¹;
- сеча вагітних – до 150 мг/добу ⁸;
- сеча після інтенсивного фізичного навантаження < 0,25 г/добу ¹;
- сеча, випадковий зразок - до 0,1 г/л ⁷;
- сеча, випадковий зразок – від 10 мг/л до 140 мг/л ^{6,8,9};
- ліквор - до 0,40 г/л ¹.

Нормальні величини концентрації білка у спинномозковій рідині:

- з шлуночків мозку 0,12 - 0,20 г/л;
- з великої цистерни 0,10 - 0,22 г/л;
- при люмбальній пункції 0,22 - 0,33 г/л.

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сеча. Підвищений вміст білка в сечі (протеїнурія) зустрічається при кровотечах, підвищеній проникності базальної мембрани, дефектах канальцевій реабсорбції, підвищеній концентрації в плазмі або за наявності патологічних низькомолекулярних білків (легкі ланцюги імуноглобулінів) і патологічної секреції білку в сечовивідних шляхах ^{2,11}.

Протеїнурія зустрічається практично при всіх захворюваннях, що супроводжуються порушенням абсорбції в ниркових канальцях, таких як нефротичний синдром, гломерулонефрит інфаркт нирок, злоякісні новоутворення нирок, діабетична нефропатія, синдром Фанконі, отруєння важкими металами, саркоїдоз, серповидноклітинна патологія. Протеїнурія супроводжує злоякісні і запальні захворювання сечових шляхів, дегенеративні стани і подразнення нижніх відділів сечових шляхів.

Численна мієлома, моноклональні гамопатії та інші мієлопроліферативні й лімфопроліферативні розлади також можуть викликати протеїнурію.

Протеїнурія може з'являтися після фізичної напруги (рівень протеїнурії залежить від типу навантаження і складає 22 - 340 мг/добу) , а також при психологічному стресі.

Ліквор. Підвищені рівні білка в спинномозковій рідині (СМР) спостерігаються у випадку збільшеного тиску (через пухлини мозку, спинномозкових крововиливів або поранень), при запаленнях (особливо бактеріальному менінгіті, енцефаломієліті) також як при множинному склерозі. Надлишкова концентрація загального білка в лікворі спостерігається також при синдромі Froin і ксантохромії. Збільшена проникність бар'єра кров/СМР відображається в підвищенні співвідношення СМР/кров для загального білка.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ПРИМІТКИ ^{1,2,3}:

1. Тест розроблений для визначення концентрацій загального білку в діапазоні виміру від 50 мг/л до 2000 мг/л. Якщо значення перевищує верхню межу діапазону, зразок повинен бути розведений 1+1 ізотонічним розчином NaCl (9 г/л) і отриманий результат помножити на 2. Зразки з більш низькими концентраціями варто брати в більших обсягах (наприклад, 50 мкл зразка + 1000 мкл реагенту).

2. Псевдонегативні результати можуть бути отримані при дослідженні високо забуференої лужної сечі. При цьому в дослідженні за допомогою діагностичних тест - смужок за тих же умов можуть бути отримані помилково-позитивні результати.

3. Кювети і посуд, що використовуються при аналізі, повинні бути цілком чистими, спеціально підготовленими, тобто замоченими на декілька годин у HCl (концентрація біля 2 моль/л), а потім **ретельно промити** та висушеними.

4. Після аналізу кювети і посуд цілком відмиваються 10% розчином амоніаку, ретельно промиваються та висушуються.

5. Враховуючи виражені коливання рівня протеїнурії в різний час доби, а також залежність концентрації білка в сечі від діурезу та різний його вміст в окремих порціях сечі, нині, при патології нирок прийнято оцінювати вираженість протеїнурії по добовій втраті білка із сечею, тобто визначати так звану добову протеїнурію. Вона визначається в г/добу. При неможливості збору добової сечі рекомендується визначати в разовій порції сечі концентрації білка і креатиніну. Оскільки швидкість виділення креатиніну протягом дня досить постійна і не залежить від зміни швидкості сечовиділення, відношення концентрації білка до концентрації креатиніну постійне. Дане відношення добре корелює з добовою екскрецією білка, отже, може використовуватися для оцінки вираженості протеїнурії. У нормі відношення білок/креатинін повинно бути менше **0,2**. Білок і креатинін вимірюють в г/л (для креатиніну: г/л = мкмоль/л × **0,000113**). Важливою перевагою методу оцінки вираженості протеїнурії по співвідношенню білок-креатинін є повне виключення помилок, пов'язаних з неможливістю або неповним збиранням добової сечі.

6. Розраховано при витраті розчину реагенту 1,0 мл (мікро-), 2,0 мл (напівмікро-), 4,0 мл (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

МОНОРЕАГЕНТ : Аналізуємий розчин 50 : 1

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Інтерференція результатів при прийомі антибіотиків й аміноглікозидів.
На хід визначення також можуть впливати інші ліки і речовини ¹⁰.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Калібрувальний розчин включає азид натрію (отруйна речовина).

ПАРАМЕТРИ ПРОГРАМУВАННЯ

Найменування набору реактивів	Загальний білок-УЛ
Тип аналізатора (напівавтомат/автомат)	будь-який
Метод виміру	КТ
Зміна оптичної щільності	Збільшується
Довжина хвилі, нм	600
Вимір проти	Контрольної проби
Температура реакції, °C	18-25
Чинник	-
Концентрація стандарту	1
Співвідношення реагент/проба (мкл/мкл)	1000 : 20
Кількість вимірів, не менше	1
Час передінкубації, с	-
Час реакції, с	600
Одиниці виміру	г/л
Верхня межа абсорбції контрольної проби, А	0,8
Нижня межа абсорбції контрольної проби, А	0,00
Максимально допустиме $\Delta E/xv$, А	-
Межі лінійності	0,05-2,00
Максимум норми	-
Мінімум норми	-
Підтвердження лінійності (так/ні)	ні

ЛІТЕРАТУРА

1. Енциклопедія клінічних лабораторних тестів (під ред. Н.У.Тица). «Лабінформ», Москва, 1997, стор. 77.
2. Johnson AM, Rohlf's EM, Silverman LM. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 477-540.
3. Felgenhauer K. Laboratory diagnosis of neurological diseases. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p.1308-1326.
4. Boege F. Urinary proteins. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 382-400.
5. Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P, Bernard S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. Clin Chem 1989;35:2233-2236.
6. Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex. Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clin Chem 1986; 32:1551-1554.
7. Tietz, N.W.: Fundamental of clinical chemistry (1976):356, 358, 369.
8. Stanbio Total Protein (CSF/Urine).Procedure No. 0340.
9. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S. Color reaction between pyrogallol red molybdenum (VI) complex and protein. Bunseki Kagaku 32: E379-E386, 1983.
10. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.
11. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
12. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



ТОВ НВП «Філіцит-Діагностика»,
Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: felicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>